

Project 505.0740

Ontwikkeling van biotechnologische methoden van onderzoek

Projectleider drs. R. Schilt

Rapport 90.51

December 1990

De ontwikkeling van een multiscreenings-
methode voor β -agonisten in urine.

W. Haasnoot, G.D. van Bruchem,

A.R.M. Hamers en drs. R. Schilt

Medewerkers: ing. M.E. Ploum

ir. P.L.M. Berende

P. Stouten

ir. A. van Mallegheem (Rijks Universiteit Gent)

Afdeling Biofarmaceutische Analyse

Goedgekeurd door: dr. F.A. Huf

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

Directeur
Sectorhoofden
Projectleider
Afdeling Biofarmaceutische Analyse (7x)
Afdeling Diergeneesmiddelen
Afdeling Organische Contaminanten
Programmabeheer en informatieverzorging (2x)
Bibliotheek
Circulatie

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden
Directie Veterinaire Dienst
Directie Veehouderij en Zuivel
Directie Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees
Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees - Centraal Laboratorium (L.M.H. Frijs)
Directie Algemene Inspectiedienst
Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, Veterinaire Hoofdinspectie
Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (dr. R.W. Stephany)
Produktschap Vee en Vlees
Benelux Economische Unie, Werkgroep SP/Lab/h Hormonen en Anti-hormonen
Secretaris Overleggroep residuanalyse (drs. M. Vertommen)
Rijks Universiteit Gent, Fac. Landbouw, Organische Chemie (Prof. Verhé)
Rijks Universiteit Gent, Fac. Landbouw (ir. A van Malleghem)
Agralin

ABSTRACT

De ontwikkeling van een multi-screeningsmethode voor β -agonisten in urine.

The development of a multi-screenings method for β -agonists in urine.

Report 90.51

December 1990

W. Haasnoot, G.D. van Bruchem, A.R.M. Hamers and R. Schilt

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)

PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

6 figures, 4 tables, 7 annexes, 9 references

A multi-screenings method based on an enzyme immunoassay (EIA) for the determination of seven β -agonists in urine samples is described. Using a sample clean-up based on immuno-affinity chromatography (IAC), clenbuterol and mabuterol can be determined above the 0.1 ng per ml level. The detection limit of the other β -agonistic drugs (salbutamol, tulobuterol, terbutalin, cimaterol and carbuterol) is about 2 ng per ml, calculated on standard additions. Due to the presence of cross-reacting metabolites of the parent compounds, positive results are obtained at lower levels in urine samples of treated animals.

Due to these cross-reacting compounds, the test can probably be performed without a sample pretreatment. In this case, one technician can handle about 100 samples per day. So far, 1 ng of clenbuterol(units) per ml is used as the level to decide for a positive result. At this level, a GC-MS confirmation is possible. With the EIA, the identity of the β -agonist in the sample cannot be determined. For this purpose a GC-MS method is available. Additional experiments are necessary for further validation and to determine the number of fals positives and fals negatives obtained with the EIA.

Keywords: beta-agonistic drugs, urine, screening, enzyme immunoassay, anabolics.

VOORWOORD

Met dank aan het CLRVV, i.c. dhr. L.M.H. Frijns, voor het verstrekken van blanco- en positieve urinemonsters en voor het uitvoeren van een aantal GC-MS analyses.

Inhoudsopgave

Abstract	1
Voorwoord	2
Samenvatting	5
<hr/>	
1 Inleiding	7
2 Methoden van onderzoek	8
2.1 Principe van de EIA	8
2.2 Karakterisering van de gebruikte antilichamen	8
2.3 Synthese van enzymgelabelde verbindingen	9
2.4 Keuze van de monstervoorbewerking	9
2.5 Vergelijking met een commercieel verkrijgbare EIA	10
2.6 Bevestigingsmethode (IAC/GC-MS)	11
2.7 Onderzochte monstermaterialen	11
3 Resultaten en discussie	12
3.1 Calibratiecurven	12
3.2 Kruisreactiviteit van de antilichamen	12
3.3 Onderzoek van urinemonsters	14
4 Aanbevelingen voor verder onderzoek	18
4.1 Vergelijkend onderzoek	18
4.2 Dierexperimenteel onderzoek	18
4.3 Isoleren en karakteriseren van metaboliëten	18
4.4 Andere matrices	19
4.5 β -receptoren	19
4.6 Nieuwe antisera	19
5 Conclusie	20
Literatuur	21
Bijlagen I t/m VIII	22 t/m 35

()

()

SAMENVATTING

Het kunnen waarnemen van het gebruik van β -agonisten is voor zowel de keuring als in het kader van de opsporing door de Algemene Inspectie Dienst (AID) van groot belang. Om de keurings- en opsporingskosten zo laag mogelijk te houden en het aantal te onderzoeken monsters te kunnen vergroten is een onderzoek gestart naar een multi-screeningsmethode in urine (voor de bepaling van een zevental β -agonisten) waarvan de eerste resultaten in dit rapport worden beschreven.

De multi-screeningsmethode is gebaseerd op een enzym immunologische test (EIA). Hierbij worden (polyclonale) antilichamen gebruikt voor de herkenning van clenbuterol en kruisreagerende verbindingen (metabolieten en andere β -agonisten). Door gebruik te maken van een monstervoorbewerking op basis van immuno-affiniteitschromatografie (met dezelfde antilichamen als gebruikt bij de EIA) wordt voor de β -agonisten clenbuterol en mabuterol in urine een detectiegrens verkregen van ca. 0,1 ng/ml. Andere β -agonisten, zoals: salbutamol, tulobuterol, terbutaline, cimaterol en carbuterol, waarvoor de gebruikte antilichamen een lagere kruisreactiviteit vertonen, kunnen met behulp van deze screeningstest worden gemeten vanaf het 2 ng/ml niveau. Bovenstaande waarden voor de detectiegrenzen zijn gebaseerd op standaardadditie-metingen. Gebleken is dat de test in de urine van behandelde dieren, vermoedelijk door de aanwezigheid van kruisreagerende metabolieten, op een lager niveau tot positieve resultaten leidt. Om met de EIA verkregen positieve resultaten te kunnen bevestigen met de combinatie immuno-affiniteitschromatografie en GC-MS is gekozen voor 1 ng/ml (uitgedrukt in clenbuterolequivalenten) als grenswaarde. Op dit niveau kan de EIA waarschijnlijk ook zonder monstervoorbewerking worden uitgevoerd. Hierdoor is het mogelijk om ca. 100 monsters per dag per analist te screenen op de aanwezigheid van een zevental β -agonisten. De globaal berekende analysekosten (onder andere afhankelijk van het aantal per dag te analyseren monsters) zijn dan in de orde van fl 50,- per monster. Vergeleken met de nu gebruikte GC-MS methode (fl 400,- tot fl 800,- per monster) kan bij gebruik van de screeningsmethode een besparing op de keuringskosten worden verkregen of kan met hetzelfde budget een aanzienlijk groter aantal monsters worden geanalyseerd. Tevens is er een duidelijke winst in analysetijd.

Met behulp van de EIA kan geen onderscheid worden gemaakt tussen de afzonderlijke β -agonisten. Om de identiteit van de aanwezige β -agonist vast te stellen dienen de met de EIA verkregen positieve monsters bevestigd te worden met een massaspectrometrische methode.

Alvorens deze "multi-screenings" methode in de routine controle toe te kunnen passen moet een meer uitgebreid vergelijkingsonderzoek met de nu toegepaste GC-MS methode worden uitgevoerd. Aanbevelingen worden gegeven voor verder onderzoek naar onder andere de uiteindelijke keuze van een monstervoorbewerkingsprocedure, uitbreiding van het aantal te bepalen β -agonisten, het uitvoeren van dierexperimenten voor het vaststellen van de aanwezigheid van metabolieten en het toepassen van de test voor andere matrices (zoals bijvoorbeeld veevoeders en lever).

()

.

()

1 INLEIDING

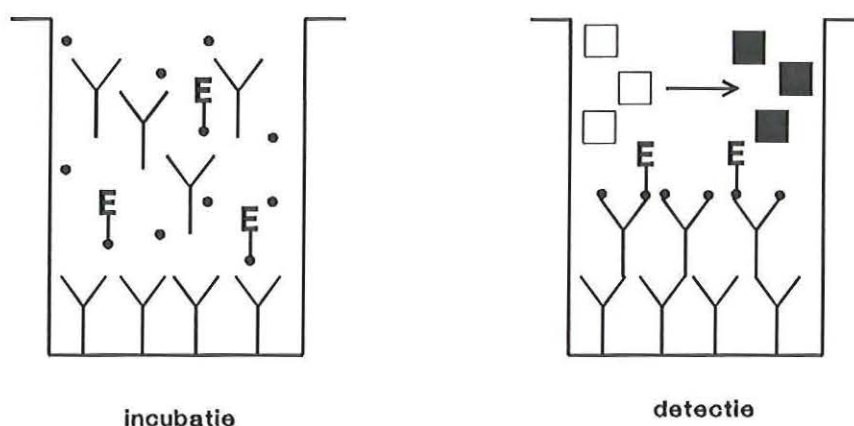
Stoffen als clenbuterol, cimaterol, salbutamol, terbutaline, mabuterol, tulobuterol en bamethaan behoren tot de groep van de β_2 -selectieve agonisten of mimetica (β -agonisten). De werking van β -agonisten wordt uitgeoefend door stimulatie van specifieke receptoren die in het gehele lichaam aanwezig zijn. Normaliter worden deze receptoren gestimuleerd door de hormonen adrenaline en (in mindere mate) noradrenaline, die door de bijnieren worden gesynthetiseerd en afgegeven. Doordat het effect via hetzelfde mechanisme wordt veroorzaakt als bij adrenaline en noradrenaline het geval is, kunnen de β -agonisten worden beschouwd als stoffen met een hormonale werking, vergelijkbaar aan de situatie met de synthetische steroïdhormonen (Schilt 1989). Bij toediening van de β -agonisten aan landbouwhuisdieren is een positief effect gevonden op de groei en de vlees/vetverhouding, het zogenaamde "herverdelende effect".

Clenbuterol is, voor therapeutische gebruik (als bronchospasmolyticum, verwijderen van de bronchiën), als enige β -agonist geregistreerd op de Nederlandse markt voor toepassing bij paarden en, op attest van een dierenarts, bij runderen tot en met een leeftijd van 14 weken. Naast clenbuterol zijn andere op clenbuterol gelijkende stoffen, zoals salbutamol, mabuterol, fenoterol en cimaterol, aangemerkt als zijnde illegaal toegepast bij de veehouderij (Van Ginkel e.a., 1990). Voor de controle op de illegale toepassing van dergelijke stoffen, in het kader van de opsporing en ten behoeve van het Nationaal Plan Overige Stoffen, wordt door het RIKILT sinds januari 1990 en door het CLRVV sinds mei 1990 gebruik gemaakt van een analysemethode gebaseerd op gaschromatografie in combinatie met massa-spectrometrie (GC-MS) na opzuivering van de urine- en veevoedermonsters met behulp van immuno-affiniteitschromatografie (IAC) (RIKILT standaard voorschrift Nr A0622). Hierbij wordt gekeken naar de β -agonisten clenbuterol, cimaterol, salbutamol, terbutaline en sinds september 1990 ook naar mabuterol. De mogelijkheid om met dezelfde IAC-kolom het aantal te bepalen β -agonisten uit te breiden wordt nog onderzocht. Hierbij is de binding aan de bij de monstervoorbewerking te gebruiken immuno-affiniteitskolom de beperkende factor. Methoden gebaseerd op GC-MS zijn echter bewerkelijk en mede daardoor vrij kostbaar (fl 400,- tot fl 800,- per analyse). Om onder andere de keuringskosten te kunnen verlagen is een onderzoek uitgevoerd naar de mogelijkheid een screeningsmethode toe te kunnen passen in het kader van het gebruik van meertraps keuringssystemen. In dit rapport worden, de tot nu toe verkregen resultaten van het onderzoek naar een "multi-screenings" methode, gebaseerd op een enzym-immunologische test ("Enzyme immunoassay" (EIA)), beschreven. Daarnaast worden aanbevelingen gedaan voor aanvullende experimenten.

2 METHODEN VAN ONDERZOEK

In dit rapport wordt een enzym-immunologische test (EIA) voor de bepaling van meerdere β -agonisten beschreven. In het hiernavolgende wordt in het kort het principe van zo'n assay en de keuze en productie van antilichamen en enzym-gelabelde verbindingen toegelicht. Daarnaast wordt een overzicht gegeven van de gebruikte monstervoorbewerkingen en het monstermateriaal. Voorts worden de karakteristieken van een commercieel verkrijgbare EIA, gebaseerd op hetzelfde principe, weergegeven.

2.1 Principe van de EIA



Figuur 1: Principe van een competitieve EIA.

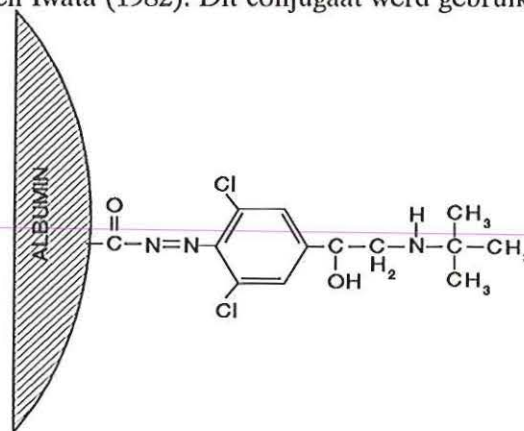
In de EIA wordt gebruik gemaakt van in een konijn opgewekte polyclonale antilichamen tegen clenbuterol gekoppeld aan runder serum albumine (zie 2.2). Deze antilichamen worden toegevoegd aan de (96) wells van een microtiterplaat waar aan de wand anti-konijnen antilichamen (opgewekt in een schaap) zijn gecoat (zie Figuur 1). Gelijk met het monster wordt een vaste hoeveelheid enzym-gelabeld salbutamol (salbutamol-"Horseradish peroxidase" (HRP)) aan de wells toegevoegd. Het in het monster aanwezige clenbuterol gaat een competitie aan met het enzym-gelabelde salbutamol om het aantal bindingsplaatsen van de antilichamen (competitieve EIA). Vervolgens wordt een substraat (TMB) toegevoegd en een kleurreactie gemeten. De intensiteit van de kleur is omgekeerd evenredig met de clenbuterolconcentratie. Een volledig protocol voor de uitvoering van de EIA is weergegeven in bijlage I.

2.2 Karakterisering van de gebruikte antilichamen

β -Agonisten zijn als zodanig niet in staat om een immuunrespons op te wekken. Hiervoor moeten

zij worden geconjugeerd aan een hoogmoleculaire verbinding. Voor dit doel werd clenbuterol via het aromatische amine (na diazoteren van het amine) gekoppeld aan runder serum albumine (Figuur 2) volgens de methode beschreven door Yamamoto en Iwata (1982). Dit conjugaat werd gebruikt voor

de immunisatie van konijnen. De polyclonale antilichamen opgewekt tegen dit conjugaat zullen hoofdzakelijk reageren met de andere zijde van het molecuul welke een tertiaire butylgroep bevat. Deze tertiaire butylgroep is ook aanwezig in andere β -agonisten, zoals: salbutamol, mabuterol, tulobuterol, terbutaline en carbuterol. Hierdoor moet het in principe mogelijk zijn om de op deze wijze verkregen antilichamen te gebruiken voor de bepaling van



Figuur 2: Structuur van clenbuterol-serum albumine.

meerdere β -agonisten. De gevoeligheid van een test hangt onder meer af van de mate van kruisreactiviteit van de antilichamen voor de β -agonisten.

2.3 Synthese van enzym gelabelde verbindingen

Bij het in dit rapport beschreven onderzoek is een tweetal enzym gelabelde verbindingen toegepast. Als enzym werd in beide gevallen "Horseradish peroxidase" (HRP) gebruikt. Clenbuterol werd op dezelfde wijze aan het HRP gekoppeld als beschreven bij de koppeling van clenbuterol aan BSA (2.2). Daarnaast werd salbutamol via een hemisuccinaat gekoppeld aan HRP. De antilichamen vertonen voor salbutamol een lagere kruisreactiviteit in vergelijking met clenbuterol (zie 3.2). Door het enzym aan salbutamol te koppelen moet een verbetering van de gevoeligheid zijn te realiseren. Salbutamolhemisuccinaat werd gesynthetiseerd volgens de procedure beschreven door Beaulieu e.a. (1985) (zie bijlage II). De koppeling van salbutamolhemisuccinaat aan HRP werd uitgevoerd volgens de procedure beschreven door Kyrein (1983) (zie bijlage III).

2.4 Keuze van de monstervoorbewerking

Om de mogelijke invloed van de matrix op de uitslag van de EIA te kunnen beoordelen zijn verschillende opzuiveringsprocedures voor urinemonsters toegepast.

2.4.1 Directe bepaling.

2.4.1.1 Urinemonsters worden, indien troebel, gefiltreerd en het filtraat wordt op pH 7,6 gebracht. Hiervan wordt 50 μ l in de test gebracht.

2.4.1.2 Urinemonsters worden, indien troebel, gefiltreerd en aan 1 ml van het filtraat wordt 4 ml fosfaatbuffer (1 M) toegevoegd. Na controleren van de pH wordt 50 μ l in de test gebracht (5 x

verduunning).

2.4.2 Solid Phase Extractie (SPE).

Aan 1 ml van het urinemonster wordt 2 ml 1 M fosfaatbuffer (pH 7,6) toegevoegd. Na controleren en zonodig bijstellen van de pH, wordt het monster op een Bond Elut C18-kolom (1 ml, Analytichem International) gebracht. Alvorens het monster op de C18-kolom te brengen wordt de kolom geactiveerd door te spoelen met achtereenvolgens 1 ml methanol, 1 ml water en 1 ml 0,4 M fosfaatbuffer (pH 7,6). Na opbrengen van het monster wordt de kolom gespoeld met water en de gebonden β -agonisten worden hierna geëluëerd met een mengsel van methanol en acetonitril (85/15, v/v). Het eluaat wordt ingedampt en het residu opgenomen in 250 μ l PBST waarvan 50 μ l in de EIA wordt gebracht (komt overeen met 200 μ l urine).

2.4.3 Immuno-affiniteitschromatografie (IAC).

Aan 1 ml van het urinemonster wordt 4 ml PBS (pH 7,4) toegevoegd en het mengsel wordt op een immuno-affiniteitskolom (IAC-kolom, 1 ml RIKILT batch 90.03) gebracht. De kolom wordt gespoeld met 5 ml water en 1 ml 80% methanol en de gebonden β -agonisten worden geëluëerd met 5 ml van een mengsel van methanol en 0,5 M azijnzuur (80/20, v/v, pH 3,5). Het eluaat wordt drooggedampt en het residu opgenomen in 250 μ l PBST waarvan 50 μ l in de EIA wordt gebracht (komt overeen met 200 μ l urine).

De IAC-kolom wordt na de elutiestap gespoeld met 5 ml van een mengsel van methanol en 0,5 M azijnzuur (80/20, v/v) en 2 x 5 ml water, waarna een volgend monster kan worden opgebracht.

2.4.4. IAC in combinatie met SPE.

De combinatie van IAC en SPE werd uitgevoerd met 1 ml urine volgens het in bijlage IV weergegeven protocol. Het uiteindelijk verkregen residu werd opgelost in 250 μ l PBST en hiervan werd 50 μ l in de EIA gebracht (komt overeen met 200 μ l urine).

2.5 Vergelijking met een commercieel verkrijgbare EIA.

De firma Riedel-de Haën (Seelze, BRD) levert een EIA (RIDASCREEN) voor de kwantitatieve bepaling van clenbuterol, salbutamol en cimaterol, gebaseerd op hetzelfde principe als hiervoor beschreven. De kosten van deze test-kit (96 wells microtiterplaat) bedragen fl 1129,=. Rekening houdend met een ijklijn van 6 concentraties en een duplo analyse, kunnen met deze test maximaal 42 monsters geanalyseerd worden. De materiaalkosten komen dan op fl 27,= per monster. In de praktijk zullen deze kosten hoger zijn omdat niet altijd exact 42 monsters per dag geanalyseerd worden en omdat per serie monsters een ijklijn moet worden meegenomen. Volgens opgave vertonen de gebruikte antilichamen (anti-clenbuterol) kruisreactiviteit voor cimaterol (10%), salbutamol (10%)

en terbutaline (13%). Volgens opgave zijn, zonder monstervoorbewerking en uitgaande van 2 µl urine in de test, de detectiegrenzen voor clenbuterol, salbutamol en cimaterol in urine respectievelijk 1, 10 en 10 ng/ml (ppb). Aangegeven wordt dat door vooraf een monstervoorbewerking (SPE voor opzuivering en concentrering) toe te passen de detectiegrenzen kunnen worden verbeterd tot 0,02 ng/ml voor clenbuterol en 0,2 ng/ml voor cimaterol en salbutamol. Deze test-kit werd aangeschaft en vergeleken met de op het RIKILT ontwikkelde test.

2.6 Bevestigingsmethode (IAC/GC-MS).

Voor de bevestiging van de aanwezigheid van β -agonisten wordt een methode gebruikt welke is gebaseerd op IAC en gaschromatografie in combinatie met massaspectrometrie (GC-MS). Met behulp van gaschromatografie worden de gederivatiseerde β -agonisten gescheiden en met massaspectrometrie worden de β -agonisten selectief gedetecteerd (per β -agonist wordt gekeken naar een aantal karakteristieke fragmenten). Voor een positieve identificatie moet de combinatie van gaschromatografische retentietijd en de massaspectrometrische intensiteiten van de fragmenten overeenkomen met die van de referentiestandaard. Voor de opzuivering van het monstermateriaal (urine, premixen en veevoeders) wordt gebruik gemaakt van IAC in combinatie met SPE. Dezelfde procedure wordt inmiddels ook toegepast door het CLRVV voor het onderzoek naar β -agonisten in het kader van het Nationaal Plan Overige Stoffen en is beschreven in een RIKILT Standaard Voorschrift (RSV A0622).

Tot nu toe zijn massaspectrometrische criteria vastgelegd voor de β -agonisten: clenbuterol, salbutamol, terbutaline en cimaterol.

2.7 Onderzochte monstermaterialen.

Tijdens dit onderzoek werden urinemonsters gebruikt welke verkregen zijn via het CLRVV en de Algemene Inspectiedienst (AID). In totaal zijn 24 urinemonsters onderzocht. Een overzicht van het gebruikte monstermateriaal wordt gegeven in bijlage V.

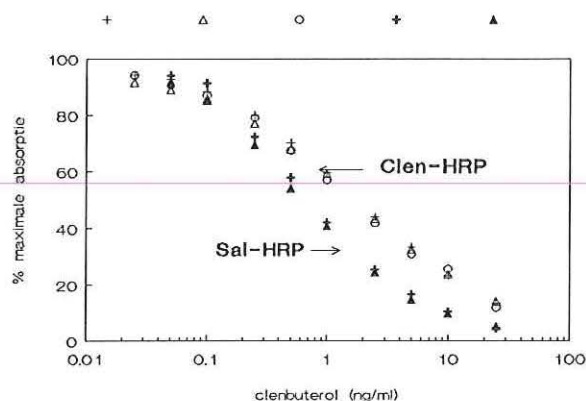
Daarnaast zijn urinemonsters onderzocht welke afkomstig zijn uit een dierproef (proefplan 454.0011, augustus 1989). Hierbij werden twee kalveren (dier 10 en 11) van ca. 5 maanden oud gedurende zeven dagen tweemaal per dag behandeld (orale toediening) met 26 ml van een preparaat (3,2 mg salbutamolsulfaat per 100 ml). Dit kwam overeen met 4,5 µg salbutamolsulfaat per kg lichaamsgewicht. Een derde kalf (dier 12) diende als controledier (geen behandeling). Van deze dieren werden vanaf 1 dag voor behandeling dagelijks vier urinemonsters genomen (rond 7.00, 13.00 en 20.30 uur en van 24 uren urine geproduceerd tussen 7.00 en 7.00 uur)

Uit een dierexperiment waarbij 4 mannelijke geitellamieren zijn behandeld (1 mg per dag, oraal) met clenbuterol (2 dieren gedurende 6 dagen en 2 dieren gedurende 21 dagen) en 4 geitellamieren niet zijn behandeld (controledieren) werden, na de slacht, urinemonsters verkregen.

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Calibratiecurven

Om met behulp van de EIA urinemonsters te kunnen controleren op de aanwezigheid van clenbuterol moet de gevoeligheid van de test ruim beneden het 3 ng/ml niveau (actiegrens) liggen. Voor het aantonen van andere β -agonisten wordt een test met een vergelijkbare gevoeligheid als noodzakelijk gesteld. In eerder beschreven experimenten (Haasnoot e.a. 1990) werd een EIA toegepast met een bereik van 2 tot 100 ng/ml. Door de hoeveelheden aan antilichamen en enzym (clen-HRP) verder te



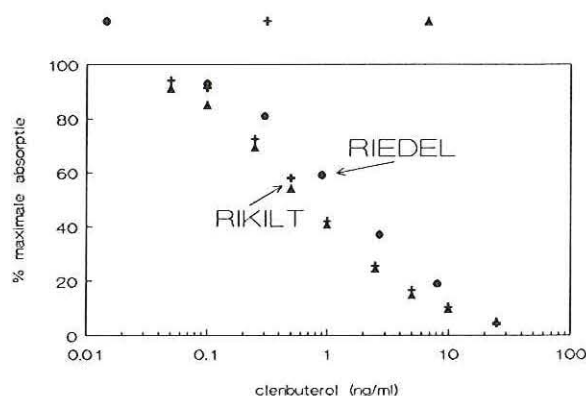
Figuur 3: Calibratiecurven van clenbuterol verkregen met clenbuterol-HRP en salbutamol-HRP.

optimaliseren werd een test met een bereik van 0,1 tot 25 ng/ml verkregen (zie figuur 3). Door in plaats van clenbuterol, salbutamol met het enzym te labelen werd een bereik van 0,05 tot 10 ng/ml verkregen (zie figuur 3). Er werd uitgegaan van een incubatietijd van 2 uur bij 4°C en voor de kleurreactie is een incubatietijd van 30 min gekozen. Langere incubatietijden leverden geen significante verbeteringen in het eindresultaat op.

De RIKILT-test werd vergeleken met de RIDASCREEN clenbuterol test (Riedel de Haën). In figuur 4 is te zien dat beide testen goed overkomen met een klein voordeel voor de RIKILT-test. De Riedel de Haën test schrijft een incubatietijd van 16 uur bij 4°C voor. Voor een screeningstest is deze stap te lang, echter, gezien onze ervaringen, kan de incubatietijd aanzienlijk worden verkort.

3.2 Kruisreactiviteit van de antilichamen.

Om de mogelijkheid te onderzoeken of de test bruikbaar zou zijn voor andere op clenbuterol gelijkende β -agonisten werden op vergelijkbare wijze calibratiecurven van een aantal β -agonisten gemaakt. In figuur 5 wordt de calibratiecurve van clenbuterol vergeleken met die van salbutamol. Door de concentratie aan clenbuterol bij 50% maximale absorptie te delen door die verkregen bij de salbutamol-calibratiecurve en dit te vermenigvuldigen met 100%, wordt het percentage kruisreactiviteit

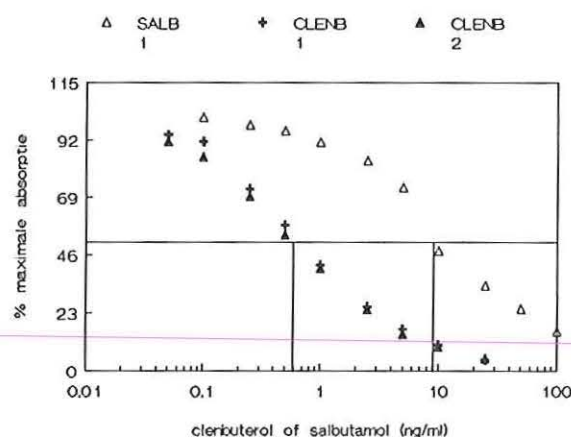


Figuur 4: Vergelijking van de calibratiecurven verkregen met de RIKILT- (Sal-HRP) en de Riedel de Haën-test.

van de antilichamen voor salbutamol berekend. In tabel I wordt de kruisreactiviteit van de antilichamen en het bereik van de calibratiecurve voor een aantal β -agonisten weergegeven.

Uit tabel I blijkt dat de anti-clenbuterol antilichamen reageren met een achttal β -agonisten. Door deze antilichamen te gebruiken bij IAC kunnen deze β -agonisten selectief uit monstermateriaal worden geïsoleerd. In de tot nu toe toegepaste controlemethode voor β -agonisten, gebaseerd op IAC in combinatie met SPE als monstervoorbewerking voor de GC-MS

(RIKILT RSV Nr. A0622), wordt gebruik gemaakt van deze antilichamen. Bij deze controle wordt tot nu toe gekeken naar een vijftal β -agonisten (clenbuterol, mabuterol, salbutamol, terbutaline en cimaterol). Uit tabel I blijkt dat de β -agonisten carbuterol, tulobuterol en pirbuterol aan deze controle kunnen worden toegevoegd. Ten behoeve van deze uitbreiding moeten voor deze drie β -agonisten gaschromatografische en massaspectrometrische criteria worden vastgesteld en moet een aantal aspecten met betrekking tot de derivatisering nader worden uitgewerkt.



Figuur 5: Calibratiecurven van clenbuterol en salbutamol (met Sal-HRP) voor de bepaling van de kruisreactiviteit van de antilichamen voor salbutamol.

Tabel I: De berekende kruisreactiviteit van de anti-clenbuterol antilichamen ten opzichte van enkele op clenbuterol gelijkende β -agonisten en het bereik van de calibratiecurven voor deze stoffen.

β -agonist	kruisreactiviteit (% t.o.v. clenb.)		bereik (ng/ml)	
	clenb-HRP	salb-HRP	clenb-HRP	salb-HRP
clenbuterol	100	100	0,1 - 10	0,1 - 10
mabuterol	120	140	0,1 - 10	0,1 - 10
carbuterol	7	18	1,5 - 150	0,5 - 50
salbutamol	4	5	2,5 - 250	2 - 200
cimaterol	3	4	3 - 300	2 - 200
terbutaline	5	4	2 - 200	2,5 - 250
tulobuterol	nb	4	-	2,5 - 250
pirbuterol	0,4	1	25 - 2500	10 - 1000
bamethaan	<0,1	<0,1	>100	>100
fenoterol	<0,1	<0,1	>100	>100

nb= niet bepaald

De EIA heeft een hoge gevoeligheid voor de bepaling van clenbuterol en mabuterol. Voor de andere β -agonisten is de kruisreactiviteit laag (1 - 18%) en daardoor ligt het bereik van de test voor deze

stoffen op een hoger niveau.

Om het bereik van de test voor de β -agonisten waarvoor de antilichamen een lage kruisreactiviteit vertonen op een gevoeliger niveau te brengen werd onderzoek uitgevoerd naar een (selectieve) concentratiestap.

3.3 Urinemonsters.

Bij een eerder uitgevoerd onderzoek naar het van nature voorkomen van nortestosteron bij varkens (Haasnoot e.a. 1990) is gebleken dat bij een EIA, uitgaande van 50 μ l urinemonster direct aan de test toegevoegd, op het lage ppb niveau vals positieve resultaten verkregen worden door matrixeffecten. Niet geïdentificeerde componenten aanwezig in het monster beïnvloeden de interactie tussen de antilichamen en het enzym-gelabelde haptene. Bij de ontwikkeling van een strip-test voor de screening van urinemonsters op de aanwezigheid van nortestosteron en clenbuterol (Ploum e.a. 1990) werd hetzelfde fenomeen waargenomen.

Vanwege deze matrixinvloeden en de mogelijkheid om een concentratiestap in te bouwen werd onderzoek uitgevoerd naar de toepassing van een eenvoudige monstervoorbewerking. Een drietal monstervoorbewerkingstechnieken (IAC, SPE en IAC + SPE) werd naast de directe bepaling (50 μ l en 10 μ l) uitgevoerd voor een tiental "blanco" urinemonsters. Hoewel deze monsters eerder door het CLRVV als negatief waren beoordeeld is het niet uit te sluiten dat deze monsters mogelijk lage concentraties aan β -agonisten bevatten (onder de detectiegrens van de GC-MS methode). Daarnaast is met de GC-MS niet gekeken naar pirbuterol en carbuterol zodat de afwezigheid van deze stoffen niet kan worden gegarandeerd.

Tabel II: Vergelijking van de gehalten aan clenbuterol (ng/ml) gevonden in 10 "blanco" urinemonsters m.b.v. de EIA (sal-HRP label) na toepassen van verschillende monstervoorbewerkingstechnieken

CLRNV nr.	Clenbuterolequivalenten in ng/ml				
	direct (50 μ l)	(10 μ l)	SPE (200 μ l)	IAC (200 μ l)	IAC+SPE (200 μ l)
90 OS 3062	0,6	0,3	1,3	1,3	3,8
90 OS 3063	0,6	0,3	0,4	1,7	0,6
90 OS 3065	0,1	0,2	0,2	<0,01	0,02
90 OS 3066	1,3	0,7	0,5	0,1	0,05
90 OS 3067	1,7	0,9	0,6	0,1	0,08
90 OS 3068	1,0	0,6	0,3	<0,01	0,02
90 OS 3069	0,1	0,1	0,1	<0,01	0,02
90 OS 3072	0,6	0,3	0,4	0,06	0,16
90 OS 3073	0,3	0,4	0,1	<0,01	0,01
90 OS 3074	0,2	0,3	0,2	0,03	0,06

Uit tabel II blijkt dat de directe EIA, waarbij 50 μ l monster direct aan de test werd toegevoegd, bij de meeste monsters de hoogste "clenbuterol"gehalten (achtergrond) geeft. Een lagere achtergrond wordt gemeten bij het gebruik van 10 μ l monster. Het toepassen van IAC als monstervoorbewerking geeft het beste resultaat met betrekking tot verlaging van matrixeffecten. Twee urinemonsters (90 OS 3062 en 3063) werden hierbij positief bevonden. Mogelijk zijn hier lage concentraties aan clenbuterol (onder de detectiegrens van de GC-MS methode ($<0,1$ ppb)) of metabolieten van clenbuterol of andere β -agonisten verantwoordelijk voor. De combinatie IAC met de EIA en de directe EIA werden toegepast op urinemonsters welke eerder met behulp van de GC-MS methode positief of verdacht positief (niet voldaan aan de GC-MS criteria) werden bevonden op clenbuterol, salbutamol of mabuterol (Tabel III). In alle gevallen werd met de combinatie IAC en EIA bij deze monsters een positieve uitslag verkregen. Het met de EIA gevonden gehalte (uitgedrukt in clenbuterolequivalenten) ligt over het algemeen hoger dan de met GC-MS gevonden waarden. Vermoedelijk zijn metabolieten waarmee de antilichamen kruisreageren verantwoordelijk voor deze verhoging. Een vergelijkbare invloed van mogelijke metabolieten werd waargenomen bij het onderzoek naar een striptest voor clenbuterol en nortestosteron (Ploum e.a. 1990).

Tabel III: Resultaten verkregen met de EIA na analyse van diverse urinemonsters welke met de GC-MS methode positief (of verdacht positief) waren bevonden voor clenbuterol, salbutamol of mabuterol.

RIKILT nr.	CLRVV nr.	EIA gehalte*		β -agonist gevonden met GC-MS	GC-MS gehalte (ng/ml)
		IAC	direct 10 μ l		
	90 OS 2487	5,2	6,2	clenbuterol	1,8
	90 OS 2527	>6	3,3	clenbuterol	0,7
	90 OS 2600	3,8	3,6	clenbuterol	3,2
	90 OS 2991	2,5	0,5	clenbuterol	0,5
	90 OS 2992	2,6	1,8	clenbuterol	1,5
	90 OS 3064	5,0	1,7	clenbuterol	0,6
90 18641		>6	1,0	salbutamol	3
90 18027		>6	0,3	salbutamol	3
90 18845		>6	28	salbutamol	76
90 18846		>6	22	salbutamol	74
90 18844		>6	33	salbutamol	115
90 18859		>6	25	mabuterol	2
90 18860		2	2,1	mabuterol	2
90 18861		1,5	11	mabuterol	2

* EIA-gehalten uitgedrukt als ng clenbuterol per ml urine.

De hoge EIA-waarden (na IAC) gevonden bij twee urinemonsters met relatief lage

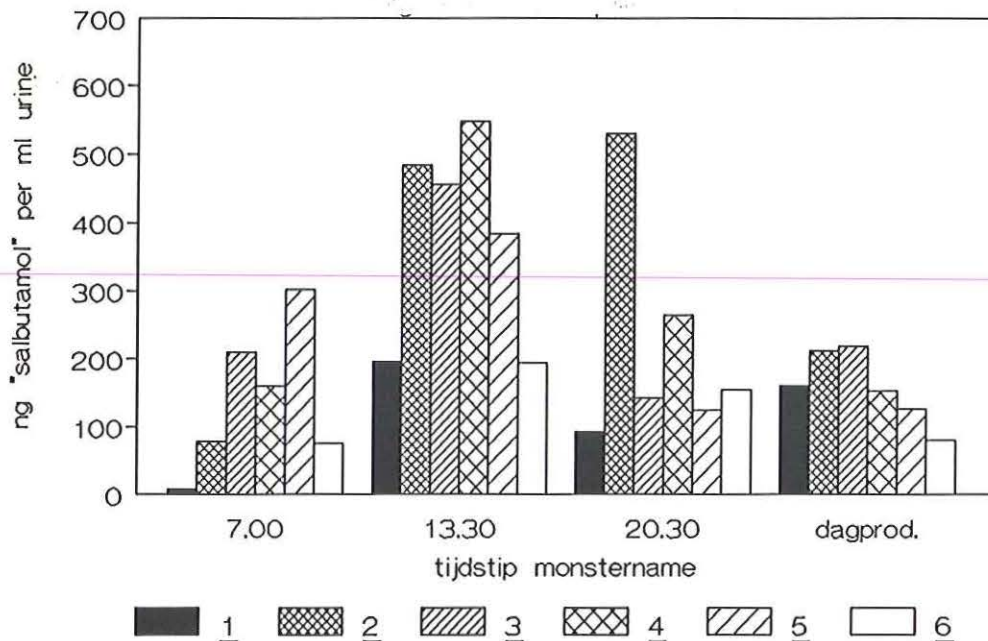
salbutamolgehalten (3 ppb) zijn opvallend. Met behulp van standaardaddities werd voor salbutamol, vanwege de lage kruisreactiviteit (5%) van de antilichamen voor salbutamol, pas een positieve uitslag verkregen op het 5 ng/ml niveau. Vermoedelijk zijn in urinemonsters van met salbutamol behandelde dieren hoge concentraties aan metabolieten aanwezig. Ook de monsters waarin met GC-MS vermoedelijk mabuterol werd aangetoond (voldeden niet volledig aan de criteria) bleken positief in de EIA. Bij het toepassen van de directe EIA uitgaande van 10 μ l monster werden de meeste monsters uit tabel III positief bevonden. Uitgaande van 1 ng/ml als grens werd echter één monster met een salbutamolgehalte van 3 ng/ml (GC-MS methode) vals negatief beoordeeld.

Bovenstaande waarnemingen geven aan dat de combinatie van IAC en EIA een zeer gevoelige test oplevert en dat 10 μ l monstermateriaal in de test voldoende is om een positief signaal te verkrijgen. In ieder geval dient de test zo te worden afgesteld dat de hiermee verkregen positieve waarden kunnen worden bevestigd met de GC-MS methode. Door een grens van 1 ng/ml (uitgedrukt in clenbuterolequivalenten) te hanteren lijkt het mogelijk om op de diverse β -agonisten te kunnen controleren.

Om de test zo eenvoudig mogelijk te houden kan gekozen worden voor een monstervolume van 10 μ l welke direct aan de test wordt toegevoegd. Het criterium voor het wel of niet positief afgeven van de urinemonsters ligt dan op 70% van de maximale absorptie ($> 70\%$ = negatief en $< 70\%$ = positief). Uit een meer uitgebreid onderzoek, waarbij de directe EIA en de combinatie IAC met EIA wordt vergeleken met de GC-MS methode, moet blijken in hoeverre de snelle directe EIA vals negatieve en vals positieve resultaten oplevert.

Urinemonsters van een met salbutamol behandeld kalf (dier 10) werden onderzocht met de directe EIA (10 μ l direct aan de test toegevoegd). Aan het kalf werd gedurende 7 dagen tweemaal daags een hoeveelheid van ca. 800 μ g salbutamolsulfaat toegediend (oraal). Vergeleken met de humane toepassing (oraal: 2 - 4 mg (sulfaat) 3 - 4 maal daags) en met de in de literatuur beschreven toepassing bij varkens (Cole 1987: 80 μ g per kg lichaamsgewicht, 2 maal daags) is dit een lage dosering. Tijdens deze toediening werden driemaal daags urinemonsters genomen. Daarnaast werd een monster genomen van de totale urineproductie over een etmaal. Alle urinemonsters van dit kalf, behalve het monster genomen op het moment van de eerste toediening, werden volgens bovenstaand criterium positief bevonden.

De gehalten aan salbutamol in deze monsters werden berekend door de met de EIA gevonden clenbuterolgehalten te vermenigvuldigen met een factor 20 (de kruisreactiviteit van de antilichamen voor salbutamol is 5%). In de urinemonsters werden op deze wijze hoge gehalten aan salbutamol gevonden (tot 550 ng/ml; zie figuur 6). Enkele van deze monsters werden eerder met de GC-MS methode geanalyseerd en de met de EIA gevonden gehalten liggen 3 - 10 maal hoger dan de GC-MS gehalten. Dit geeft wederom aan dat de aanwezigheid van kruisreagerende metabolieten in de urine van behandelde dieren zeer aannemelijk is.



Figuur 6: Gehalten aan salbutamol (EIA) in de urine van een kalf (dier 10) welke is behandeld met salbutamolsulfaat (4,6 µg per kg lichaamsgewicht). 1, 2, 3, 4, 5 en 6 zijn de dagen van behandeling.

Urinemonsters afkomstig van een dierexperiment waarbij vier geiten zijn behandeld met clenbuterol (zie 2.7) werden onderzocht met de directe EIA en met een HPLC-methode (Hooijerink 1991). In tabel IV worden de gevonden gehalten weergegeven. Hieruit blijkt dat de met clenbuterol behandelde dieren duidelijk te onderscheiden zijn van de niet behandelde dieren en dat de met de EIA gevonden waarden, vermoedelijk door de aanwezigheid van metabolieten, hoger zijn dan de met HPLC gevonden gehalten.

Tabel IV: Gehalten aan clenbuterol (ng/ml) gevonden met de directe EIA en met een HPLC-methode in urinemonsters afkomstig van een dierexperiment waarbij vier geiten zijn behandeld met clenbuterol.

RIKILT nr.	Omschrijving	Gehalte aan clenbuterol (ng/ml)	
		EIA	HPLC
90 53758	21 dagen behandeld	131	41
90 53759	21 dagen behandeld	134	29
90 53760	6 dagen behandeld	146	98
90 53761	6 dagen behandeld	14	1,5
90 53762	niet behandeld	0,9	<1
90 53763	niet behandeld	0,4	<1
90 53764	niet behandeld	0,8	<1
90 53765	niet behandeld	0,6	<1

4. AANBEVELINGEN VOOR VERDER ONDERZOEK

4.1 Vergelijkend onderzoek.

Voordat de in dit rapport beschreven test bij de routinecontrole toegepast kan worden is een meer uitgebreid vergelijkend onderzoek met de nu gebruikte GC-MS methode noodzakelijk. Hierbij gaat het vooral om het vaststellen van de te hanteren grens voor het wel of niet positief afgeven van de monsters. Zoals de experimenten nu uitwijzen kan deze grens op 1 ng/ml (clenbuterolequivalenten) worden gehanteerd. Het is echter mogelijk dat deze grens, na analyse van een grotere serie monsters, aangepast moet worden om het aantal vals positieve en vals negatieve uitslagen te minimaliseren. Voorgesteld wordt om gedurende 2-3 maanden urinemonsters te analyseren welke eveneens door het CLRVV (GC-MS methode) worden onderzocht (ca. 200 monsters). Hierbij wordt de directe EIA (10 μ l monster) vergeleken met de combinatie IAC en EIA. De mogelijkheid om de monstervoorbewerking met IAC te kunnen automatiseren wordt onderzocht. Hiervoor is tijdelijk (3 maanden) door de firma Gilson een ASPEC-systeem (Automatic Sample Preparation with Extraction Columns) ter beschikking gesteld.

4.2 Dierexperimenteel onderzoek.

In principe is het mogelijk om met de in dit rapport beschreven test urinemonsters op de aanwezigheid van zeven β -agonisten te onderzoeken. De gevoeligheid van de test voor β -agonisten is hoog, zelfs voor β -agonisten waarvoor de gebruikte antilichamen een lage kruisreactiviteit vertonen. Deze gevoeligheid is mede te danken aan de vermoedelijke aanwezigheid van kruisreagerende metabolieten van de β -agonisten in urine. Deze bewering is gebaseerd op het onderzoek van urinemonsters afkomstig van dieren welke met clenbuterol, mabuterol en salbutamol zijn behandeld. Vergelijkbaar materiaal van dieren behandeld met tulobuterol, cimaterol, pirbuterol en terbutaline zou onderzocht moeten worden om te kunnen bewijzen of de test op eenzelfde gevoeligheid kan worden gehanteerd bij de controle op deze β -agonisten. Hiertoe moeten vier kalveren worden behandeld met de vier β -agonisten op overeenkomstige wijze als eerder uitgevoerd bij de salbutamoldierproef (2.7).

4.3 Isolatie en karakteriseren van metabolieten.

Bij urinemonsters afkomstig van met clenbuterol, mabuterol en salbutamol behandelde dieren zijn sterke aanwijzingen dat metabolieten van de oorspronkelijk toegediende stof aanwezig zijn. Vooral bij salbutamol worden hoge concentraties aan metabolieten verwacht. Voorgesteld wordt om deze metabolieten uit urinemonsters van behandelde dieren te isoleren en te karakteriseren. Mogelijk kan door de aanwezigheid van deze metabolieten in urine het gebruik van de oorspronkelijke stof op een lager niveau en dus eveneens op een later tijdstip na toediening worden aangetoond.

4.4 Andere matrices.

Naast urine worden andere matrices zoals veevoeders, premixen en weefsels aangeboden voor onderzoek. De in dit rapport beschreven test kan in principe aangepast worden voor dit soort monsters. Hierbij zal het accent moeten liggen bij het ontwikkelen van eenvoudige monstervoorbewerkingprocedures alvorens de test te kunnen toepassen.

4.5 β -receptor.

Tot nu toe worden antilichamen gebruikt voor biospecifieke interacties met de β -agonisten. De specificiteit van antilichamen kan nadelig zijn indien meerdere β -agonisten bepaald moeten worden. Aangezien de werking van β -agonisten wordt uitgeoefend door stimulatie van specifieke receptoren, die in het hele lichaam aanwezig zijn, lijken voor de bredere aanpak van de analyseproblematiek, deze receptoren meer geschikt als groepspecifiek reagens. Voorgesteld wordt om het onderzoek naar de isolatie van de β -receptor en de mogelijkheid om de antilichamen te vervangen door deze receptor te intensiveren.

4.6 Nieuwe antisera.

Met de in dit rapport beschreven test kunnen zeven β -agonisten worden geanalyseerd. Echter via o.a. de AID is al gevraagd naar het opzetten van een analysemethode voor b.v. fenoterol. Daarnaast worden andere β -agonisten genoemd als zijnde in aanmerking komend voor controle (o.a. ractopamine). Het scala aan te analyseren β -agonisten moet derhalve worden uitgebreid en daartoe zijn andere typen antilichamen, voor zowel de toepassing bij de monstervoorbewerking (IAC) ten behoeve van de GC-MS methode als voor een sceeningstest, nodig. Hierbij kan gedacht worden om per β -agonist een antilichaamproduktie op te zetten. Een andere benadering is om antilichamen te produceren die in principe geschikt moeten zijn voor een aantal β -agonisten (multi-benadering). In bijlage VI en VII wordt een tweetal stoffen genoemd welke in aanmerking komt voor antilichaamproduktie en waarvan de antilichamen in theorie geschikt zouden kunnen zijn voor zo'n multi-benadering. Het lijkt zeer nuttig om de antilichaamproduktie tegen deze stoffen op korte termijn op te starten.

5. CONCLUSIE

De in dit rapport beschreven test lijkt geschikt te zijn voor het screenen van urinemonsters op de aanwezigheid van een zevental β -agonisten. De werking van de test is bewezen voor de β -agonisten clenbuterol, mabuterol en salbutamol. Voor de andere β -agonisten zoals tulobuterol, cimaterol, terbutaline en carbuterol moet de werking van de test op het lage ng/ml niveau nog nader worden onderzocht. Hierbij is het voorkomen van metaboliëten van de toegediende β -agonisten in urine, waarmee de gebruikte (anti-clenbuterol) antilichamen kruisreageren, van belang. Voor dit doel is een nadere onderbouwing in de vorm van dierproeven noodzakelijk. Het lijkt aannemelijk dat de metaboliëtvorming van de overige β -agonisten op een vergelijkbare wijze zal plaatsvinden als bij salbutamol en/of clenbuterol. Door bij de test een minimale monstervoorbewerking toe te passen, kunnen ca 100 urinemonsters per dag door één analist worden geanalyseerd. Door een eenvoudige monstervoorbewerking (IAC) toe te passen kan de test op een nog gevoeliger niveau worden gebracht. Deze voorbewerking gaat echter ten koste van de snelheid van de test en gezien de resultaten verkregen met urinemonsters van behandelde dieren lijkt het voorlopig niet noodzakelijk de test op een gevoeliger niveau te brengen. Alvorens de test in de routinecontrole toe te passen dient een meer uitgebreid vergelijkingsonderzoek met de nu toegepaste GC-MS methode te worden uitgevoerd. Hierbij is met name van belang of bij de gekozen grens van 1 ng/ml (uitgedrukt in clenbuterolequivalenten) met de GC-MS methode ook positieve waarden worden verkregen (zo laag mogelijk percentage vals-positieven (<5-10%). Daarnaast moet het aantal vals-negatieven eveneens zo laag mogelijk worden gehouden.

Om de test geschikt te maken voor een nog groter aantal β -agonisten moeten andere typen antilichamen opgewekt worden. Verwacht wordt dat antilichamen opgewekt tegen norepinefrine en octopamine de mogelijkheid geven om het scala aan te testen β -agonisten fors uit te breiden. Hiernaast is onderzoek naar toepassing van de β -receptor (in plaats van antilichamen) van belang. Deze β -receptor reageert immers met alle farmacologisch actieve β -agonisten, zodat de test multi-inzetbaar wordt. Daarnaast lijkt het zinvol om de test ook toepasbaar te maken voor andere matrices als bijvoorbeeld veevoeders en weefsels. De globaal berekende analysekosten (o.a. afhankelijk van het aantal per dag te analyseren monsters) per monster bedragen fl 50,-, hetgeen in vergelijking met de arbeidsintensieve GC-MS procedure (fl 400,- tot fl 800,- per monster) een grote besparing in de keuringskosten kan opleveren. Bij gebruik van de commercieel verkrijgbare test zullen de analysekosten, gezien de relatief hoge materiaalkosten, ca fl 20,- hoger zijn.

LITERATUUR

- Beaulieu N, Charette C, Loo J.C.K, Jordan N en McGilveray I.J., Salbutamol radioimmunoassay: Synthesis and properties of the benzylic succinate of salbutamol, J. Pharm. An. 3 (1985) 575.
- Cole D.J.A. e.a., CEC Seminar "Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality", Brussel 19-20 mei 1987, J.P. Hanrahan (Ed.), Elsevier p 137.
- Van Ginkel L.A., Stephany R.W. en Van Rossum H.J., Mabuterol identified as an illegally used beta-agonistic growth promotor for slaughter animals, RIVM rapport 388701 009, juni 1990.
- Haasnoot W, Ploum M.E, Paulussen R.J.A, Schilt R en Huf F.A, Rapid determination of clenbuterol residues in urine by high-performance liquid chromatography with on-line automated sample processing using immunoaffinity chromatography, J. Chrom. 519 (1990) 323.
- Hooijerink H, Schilt R, Haasnoot W en Courtheijn D, Determination of clenbuterol in urine of calves by HPLC with sequential ultraviolet and electrochemical detection, aangeboden voor publicatie in J. Pharm. An. (1991).
- Kyrein H.J., Der Radioimmunoassay für Steroidhormone, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch 177 (1983) 426.
- Ploum M.E, Haasnoot W, Paulussen R.J.A, van Bruchem G.D, Hamers A.R.M, Schilt R en Huf F.A, Test-strip enzyme immunoassays and the fast screening of nortestosterone and clenbuterol residues in urine samples at the parts per billion level, geaccepteerd voor publicatie in J. Chrom. (mei) 1991.
- Schilt R, Farmacologie en analysemethoden voor de residu-bepaling van beta(2)-agonisten, RIKILT rapport 89.47, september 1989.
- Yamamoto I en Iwata K., Enzyme immunoassay for clenbuterol, a beta-2-adrenergic stimulant, J. Immunoassay 3 (1982) 155.

BIJLAGE I: Protocol voor het uitvoeren van de directe EIA.

EEN MULTISCREENINGSMETHODE VOOR DE BEPALING VAN β -AGONISTEN IN URINE VAN KALVEREN, RUNDEREN EN VARKENS M.B.V. EEN COMPETITIEVE ENZYM IMMUNOASSAY.

Literatuur: M.E.Ploum, W. Haasnoot, R.J.A. Paulussen, G.D.van Bruchem, A.R.M. Hamers, R. Schilt and F.A. Huf. Test-strip enzyme immunoassay and the fast screening of nortestosterone and clenbuterol residues in urine samples at the parts per billion level. Accepted for publication in J.Chromatogr(may 1991).

Inleiding:

Clenbuterol, salbutamol, cimaterol, mabuterol en terbutaline behoren tot de groep van de β -agonisten. Bij toediening van β -agonisten aan landbouwhuisdieren is een positief effect gevonden op de vlees/vetverhouding. Op de Nederlandse markt is voor therapeutisch gebruik alleen clenbuterol geregistreerd voor de toepassing bij paarden en runderen (tot een leeftijd van 14 weken).

Daarnaast kunnen andere β -agonisten zoals salbutamol, cimaterol, mabuterol en terbutaline illegaal gebruikt worden.

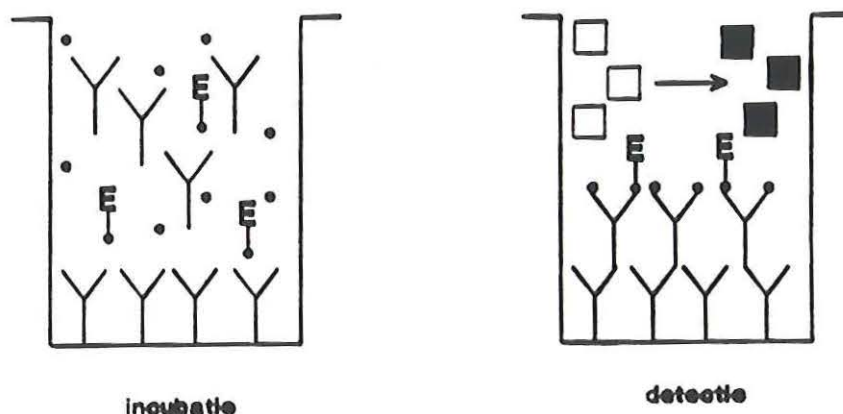
Het kunnen waarnemen van het gebruik van β -agonisten is voor zowel de keuring als in het kader van de opsporing door de AID van groot belang. Hiervoor is een screeningmethode, gebaseerd op een enzym immunologische test, ontwikkeld. Met behulp van deze test kunnen de β -agonisten clenbuterol en mabuterol worden gemeten in urine vanaf 1 ng/ml niveau. Voor de β -agonisten salbutamol, tulobuterol, terbutaline, carbuterol en cimaterol is de test, vanwege de lage kruisreactiviteit van de antilichamen voor deze stoffen, minder gevoelig (10-20 ng/ml). Echter, zoals bewezen voor salbutamol (rapport no. 90.51. december 1990) worden urine monsters afkomstig van behandelde dieren, vermoedelijk door de aanwezigheid van kruisreagerende metabolieten positief bevonden vanaf een niveau van ca. 5 ng/ml voor de oorspronkelijke stof. Bovenstaande detektiegrenzen zijn gebaseerd op een directe EIA (zonder monstervoorbewerking).

De test maakt geen onderscheid tussen de verschillende β -agonisten en urinemonsters worden positief bevonden indien het gehalte, uitgedrukt in clenbuterol-equivalenten, groter is dan 1 ng/ml.

PRINCIPE VAN DE EIA.

Het principe van de test is gebaseerd op de antigeen-antilichaam reactie (figuur 1). In een konijn worden polyclonale antilichamen (PCA) opgewekt tegen het clenbuterol wat gekoppeld is aan runder serum albumine. De wells van een microtiterplaat zijn gecoat met anti-konijn antilichamen (opgewekt in een schaap). Clenbuterol antilichamen, enzym-gelabeld-salbutamol en monster of clenbuterolstandaard worden in de wells gebracht. Vrij clenbuterol en enzym-gelabeld-salbutamol competeren om de

bindingsplaatsen van de antilichamen. Tegelijkertijd worden de clenbuterol-antilichamen gebonden door de aan de wand geïmmobiliseerde antikoniijn antilichamen. De detectie verloopt volgens een kleurreactie door toevoeging van substraat (peroxide) en chromogeen (tetramethylbenzidine). Gebonden enzym-gelabeld-salbutamol verandert het kleurloze chromogeen in een blauw gekleurd chromogeen. Door toevoeging van een stopreagens (fosforzuur) verandert de kleur in geel. De mate van kleuring wordt fotometrisch bepaald bij 450 nm. De intensiteit van de kleur is omgekeerd evenredig met de clenbuterolconcentratie.



Figuur 1: principe van een competitieve EIA

Benodigdheden:

Microtiter ELISA plates (Greiner art. 655161-steriel EIA-plaat en Labstar cat. 1.1040E microtiterplaat voor het verdunnen van de monsters)- Wellwasher (4x)(Denley)- Microplate Reader Argus 400-software Argus 400 (Packard Canberra)- vriezer (-20°C)- koelkast (4°C)- Vari-shaker (microtiter Dynatech)- instelbare pipetten 0.5-10 µl, 10-100 µl en 100-1000 µl (Eppendorf) - multipipet 50-200 µl (Titertek)-repeteerpipet 25-1250 µl (Eppendorf) - plate sealers (Costar cat 3095) - Acrodisc 0,2 µm (Gelman no. 4192) - Ph-papier 5-10 (Merck art. 9533)- Sheep anti-rabbit IgG (Sigma R-9754) - Coatingsbuffer (protocol 15a)- FBS/Tween-PBS/Tween/antifoam (protocol 15a)- antiserum 171 Batch 1-clenbuterol (verkregen van Boehringer Ingelheim- salbutamol-HRP conjugaat(protocol 28A-28B-29A-29B)- TMB peroxidase substraat systeem (protocol 15 commercieel).

Werkwijze:

1. Coating

- het schaap-antikonijn IgG (Shar) wordt aan de EIA-plaat (Greiner) gekoppeld. Concentratie is 10 µg/ml coatingbuffer (protocol nr. 15a). Volume: 100 µl per well.
Incubatie: Overnacht bij 4°C in de koelkast.

2. Standaardenreeks

- maak een standaardreeks uitgaande van een clenbuterol standaard met een concentratie van 1 mg/ml in ethanol (bewaard bij -20°C vriezer) in PBS/Tween met de volgende concentraties: 0- 0,1-0,25- 0,5- 1,0- 2,5- 5 ng/ml.
Let er op dat de standaarden altijd bij 4°C in het donker bewaard worden i.v.m. lichtgevoeligheid.

3. Voorbehandeling urine

- filtreer de urine, wanneer deze niet helder is. neem een aliquot van de urine en filtreer dit over een Acrodisc(steriel) 0,2 µm.
- breng de urine op pH 7 met pH-papier 5-10.
- verdun de urine 5x:
- pipetteer 200 µl PBS/T in een well van een microtiterplaat (Labstar)
- pipetteer 50 µl urine in de well bij de PBS/T van de microtiterplaat (Labstar).
- meng de inhoud van de well m.b.v. de vari-shaker 2 minuten stand 6.

4. Antiserum verdunning

- maak een verdunning van AS 171-B1 van 1:5000(final dilution 1:200000) in PBS/T. Per plaat is 2,5 ml nodig.

5. Salbutamol- horseradish peroxidase (Sal-HRP).

- maak een verdunning van Sal-HRP (batch 1* A.v.Mallegghem) van 1:500(final dilution 1:2000) in PBS/T. Per plaat is 2,5 ml nodig.

6. Werkwijze

- was de EIA-plaat (Greiner) met de wellwasher 4x300 µl met de wasvloeistof (PBS/T/antifoam).
- klop de plaat leeg op de tafel.

- voeg aan de wells 50 µl standaardoplossing (punt 2) of 50 µl verdunde monsteroplossing (punt 2) toe (duplo) m.b.v. multipipet (zie voor plaatindeling figuur 2).
- voeg aan de wells 25 µl van het Sal-HRP conjugaat (punt 4) toe m.b.v. repetierpipet.
- voeg nu 25 µl van de antiserumverduunning (punt 4) toe per well.
- totaalvolume : 100 µl per well.
- meng de inhoud van de wells m.b.v. de vari-shaker 10 min bij stand 6.
- incubeer 2 uur bij 4 °C in de koelkast.

7. Kleurreactie

- was de microtiterplaat met de wellwasher 4x300 µl met de wasvloeistof (PBS/T/antifoam).
- klop de plaat leeg op de tafel.
- voeg 100 µl TMB substraatoplossing per well toe (protocol 15 commercieel). Per plaat is 10 ml nodig.
- incubeer 20 minuten bij kamertemperatuur in het donker.

8. Stoppen

- stop de kleurreactie met 100 µl 1 M H3PO4 per well.
- meng de inhoud van de well m.b.v. de vari-shaker 1 min op stand 6.

9. Meting

- bepaal de extinctie spectrofotometrisch met de Argus 400(zie voor de instelling figuur 3 en 4).
- geef in het protocol de fitting method 4-parameter op.
- geef in de file setup een golflengte van 450 nm op.
- geef de juiste template op.

Template: S12TM36.MAP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
J	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Enter 's' then the concentration to enter standard, or enter 'd' for dilution.
 Ctrl-R to replicate a set Ctrl-S to save template Ctrl-L to setup a set
 Ctrl-D to enter dilutions Esc to Menu Bar Ctrl-M to enter cell name
 150-1 S12TM36

Figuur 2: template indeling

```

                                Protocol Name: 450-1.PRT
Protocol Description
Reader File Setup 450.FIL

Assay Type          end point
Number of Readings  1
Reading Interval    15

Fitting Method      4-Parameter
Data Type           linear

Avg. Standard Replicate no
Avg. Sample Replicates before
Units of Measure     ng/ml

                                PROTOCOL REPORTS
                                Protocol Definition  no
                                Template Description  no

                                Absorbance Data      yes

                                Report of Means      no
                                Correction Value     0.000
                                Save Corrected Values no

                                Apply Formula

                                Report of Limits     no
                                Range Reporting      no
                                Histogram             none

                                ASSAY REPORTS
                                Well Slopes/R^2      no
                                Standards Results    yes
                                Sample Results       yes
                                Ctrl-S      Esc

450-1  S123M36
Template: S123M36.MAP

```

Figuur 3: protocol

```

                                File Setup Name: 450.FIL

Reading Method      Read and Eject      Absorbance Data      yes
                                Limit Report      no

                                Range Report      no

Wavelength          Single
Filter Wl           450

                                Format          Matrix

Shake               1st Read
                   Timed Shake
Shake Time(sec)    2
Shake Intensity    Low
                                RS232 Output    yes
                                Barcode         no
                                Blanking Pattern Full
                                Edit Blank Map

Factor             no

Print Heading       yes
                                File Name

                                Report Title  clonbuterol ijklin
                                Delay Initial Read Time 1

                                Ctrl-S      Esc

450-1  S123M36

```

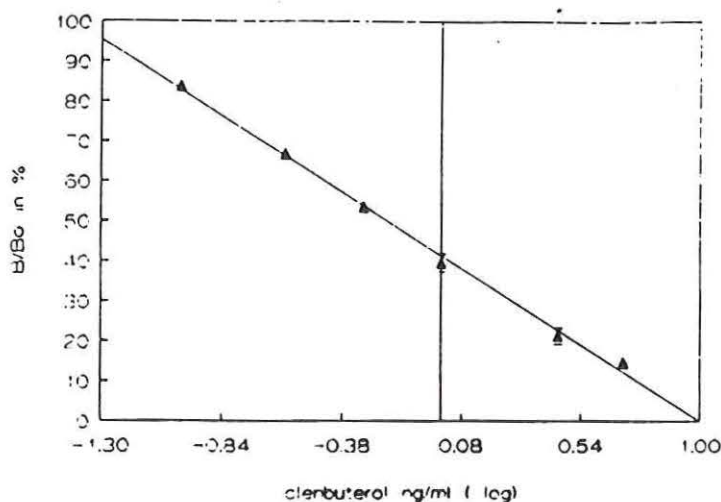
Figuur 4: file setup

10. Resultaat

- bereken de gehalten m.b.v. het Kinesmart programma aan de hand van de ijklijn, die in iedere plaat aanwezig is (delete de 0 standaard in de ijklijn).
- bereken de gehalten handmatig door de gemiddelde extinkties (bound=B) van een standaard of monster te delen door de extinktie waarde van de nulstandaard (B_0) en vermenigdvuldig deze met 100% (B/B_0).

De ijklijn moet lineair zijn over een gebied van 0,1- 5 ng/ml (figuur 5) indien de logaritme waarden op de X-as worden uitgezet.

De B/B_0 van de monsters kunnen direkt uitgezet worden in de ijklijn en de gehalten afgelezen. Monsters worden positief afgegeven indien de concentratie (uitgedrukt in clenbuterol-equivalenten) groter is dan 1 ng/ml.



Figuur 5: ijklijn van clenbuterol

BIJLAGE II: Protocol voor het bereiden van salbutamolhemisuccinaat.

PROTOCOL No: 29 A	ONDERWERP: Koppelen van Hemi-succinaat aan vrije base salbutamol.
DATUM: 1/10/90	
DOOR: A. Van Mallegheem	

KOPPELEN VAN HEMI-SUCCINAAT AAN VRIJE BASE SALBUTAMOL

Literatuur

N. Beaulieu. Salbutamol radioimmunoassay: Synthesis and properties of the benzylic succinate of salbutamol. Journal of Pharmacological analysis (1985)3:575-579

Inleiding

Salbutamol-hemi-succinaat wordt gebruikt bij de koppeling van salbutamol aan eiwitten als HRP (Horse Radish Peroxidase) en BSA (Bovine Serum Albumine) Om een goede werking van het salbutamol-HRP-conjugaat te waarborgen is de aanwezigheid van een spacer noodzakelijk. Hierdoor ondervindt de tertiaire butylgroep van het salbutamol namelijk minder sterische hindering van het HRP bij koppeling aan een antilichaam welke gericht is tegen de tertiaire butylgroep. Het hemi-succinaat kan op de phenolische en op de benzylic positie van het salbutamol binden door een lichte wijziging van het reactiemilieu, namelijk het al of niet aanwezig zijn van toluen in het reactiemilieu (Beaulieu 1985). Bij verdere experimenten (TLC,EIA) kon echter geen wezenlijk verschil opgemerkt worden tussen de beide vormen.

Benodigheden

Instelbare pipetten 10-100 µl. 0.5-5 ml - 12 ml flesjes met schroefdop - 2 ml flesjes met schroefdop - spinbar (vlo) passend in 12 ml flesje - magnetische roerder - analytische balans (tot 0.1 mg nauwkeurig) - afweegpapiertjes - aluminium-folie - Whatman 15 ml filtratie-systeem - Millipore filter type: FH 0.5 µm - droogstoof.

Chemicalien : Salbutamol (vrije base) (Sigma art.: S-8260) - Succinic Anhydride (Sigma art.: S-7626) - Ethanol absoluut (Merck art.: 983) - Toluene (Merck art.: 8325)

Werkwijze

* Benzylic salbutamol-hemisuccinaat

- Weeg 50.0 mg salbutamol nauwkeurig af op een afweegpapiertje en breng het daarna over in een 12 ml flesje
- Omwikkel het flesje met aluminium-folie
- Voeg hieraan 10.0 ml absolute ethanol toe
- Breng een vlo in het flesje en roer met de magnetische roerder tot alle salbutamol in oplossing is gegaan (± 30 minuten)
- Weeg 22.5 mg succinic anhydride nauwkeurig af op een afweegpapiertje en voeg het dan toe aan de salbutamol oplossing
- Roer gedurende 2 uren met de magnetische roerder (Na ± 30 min. ontstaat een witte suspensie)
- Breng in het Whatman filtratie-systeem (zie figuur) het bovenvermelde filter aan (op maat snijden!)
- Breng dan de suspensie over dit filter
- Was 2 maal met 2 ml absolute ethanol

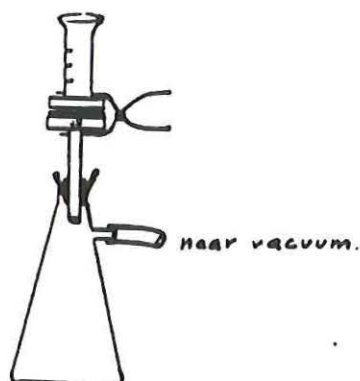
PROTOCOL No: 29 B	ONDERWERP: Koppelen van Hemi-succinaat
DATUM: 1/10/90	aan vrije base salbutamol.
DOOR: A. Van Mallegheem	

- Het filtraat van je daarna verwijderen in het van toepassing zijnde afvalvat
- Breng het filter met de daarop aanwezige kristallen voorzichtig over op een horlogeglas en plaats dit in de droogstoof gedurende ± 15 min. bij 37°C
- Schraap met behulp van een klein spateltje de kristallen zorgvuldig van het filter en verzamel ze op een afweeg-papiertje
- Breng ze daarna over in een 2 ml flesje met schroefdop
- Omwikkel het flesje met aluminium-folie
- Bewaar het flesje bij -4°C
- Rendement : $\pm 50\%$

* Phenolisch salbutamol-hemisuccinaat

- De werkwijze is volkomen analoog, behalve dat tegelijk met het succinic anhydride ook $65 \mu\text{l}$ toleen toegevoegd wordt.

Figuur van het Whatman-filtratiesysteem



BIJLAGE III: Protocol voor de koppeling van salbutamolhemisuccinaat aan HRP.

PROTOCOL NO: 28A	ONDERWERP: Koppeling van Salbutamol-HS
DATUM: 1/10/90	aan Horse Radish Peroxidase (HRP)
DOOR: A. Van Malleghem	

KOPPELING VAN SALBUTAMOL-HEMISUCCINAAT (HS) AAN HORSERADISH PEROXIDASE (HRP)

Referentie:

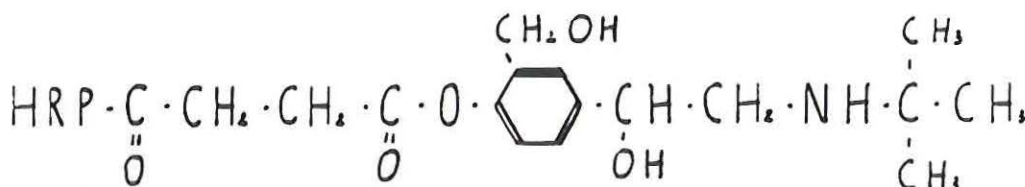
H.J. Kyrein, Der Radioimmunoassay für Steroidhormone, Grundlagen, Entwicklung und Anwendung radioimmunologischer Testverfahren, Teil 1, Lebensm. Unters. Forsch. (1983)177:419-423

H.J. Kyrein, Der Radioimmunoassay für Steroidhormone, Grundlagen, Entwicklung und Anwendung radioimmunologischer Testverfahren, Teil 2, Lebensm. Unters. Forsch. (1983)177:426-433

Inleiding

HRP gelabeld salbutamol-HS wordt gebruikt bij enzymimmunologische methoden (EIA en de dip-stick methode) voor het bepalen van $\beta(2)$ -agonisten. Voor de koppeling van salbutamol aan HRP wordt hemisuccinaat (HS) als spacer gebruikt. De procedure voor het koppelen van HS aan salbutamol wordt beschreven in protocol 29a. De koppeling van salbutamol-HS aan HRP wordt uitgevoerd overeenkomstig de procedure beschreven voor de koppeling van steroïden aan eiwitten (Kyrein). In de hierna beschreven werkwijze is bij het afwegen de verhouding salbutamol-HS tegenover HRP-enzym: 1000 mol/mol

Figuur van het salbutamol-HS-HRP



Benodigdheden

Instelbare pipet 100-1000 μ l - 2 ml flesjes met schroefdop - Safe-Lock tube (epje) van 1.5 ml (Eppendorf art.: 0030 120.086) - spinbar (vlo) passend in 2 ml flesje - magnetische roerder - analytische balans (tot 0.1 mg nauwkeurig) - afweegpapiertjes - 3 ml reageerbuisje - aluminium-folie - vibrofix VF1 (IKA Labortechnik).

Chemicaliën: Salbutamol-HS (protocol 29a) - DMF (dimethylformamide) (Merck art.: 822275) - EDC (ethyl-dimethylamino-propylcarbodiimide) (Sigma art.: E-7750) - demi-water - HRP (Boehringer art.: 814407) - Glycerine (Merck art.: 4093) - PBS (protocol 6).

Werkwijze

- Weeg 4.0 mg salbutamol-HS nauwkeurig af op een afweegpapiertje en breng het daarna over in een 2 ml flesje
- Ontwikkel het flesje met aluminium-folie

PROTOCOL No: 28 B	ONDERWERP: Koppeling van Salbutamol-HS
DATUM: 1/10/90	aan Horse Radish Peroxidase (HRP)

DOOR: **A. Van Mallegem**

- Voeg hieraan 0.5 ml DMF toe
- Breng een vloe in het flesje en roer met de magnetische roerder tot het salbutamol-HS in suspensie is gegaan
- Weeg 5.0 mg EDC nauwkeurig af op een afweegpapiertje en breng het daarna over in een 3 ml reageerbuisje
- Voeg hieraan 0.23 ml demi-water toe
- Schud het reageerbuisje tot de EDC is opgelost
- Druppel de EDC-oplossing met behulp van een 1 ml pipet langzaam (1 druppel/seconde) toe aan de salbutamol-HS-oplossing en roer het mengsel (1) m.b.v. een magnetische roerder gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur.
- Weeg 5.0 mg HRP nauwkeurig af op een afweegpapiertje en breng het daarna over in een 2 ml flesje
- Omwikkel het flesje met aluminiumfolie
- Schud het flesje tot het HRP is opgelost
- Breng een vloe in het flesje en plaats het dan op een magnetische roerder
- Druppel mengsel (1) m.b.v. een 1 ml pipet langzaam (1 druppel/seconde) toe aan de HRP-oplossing onder roeren
- Roer het mengsel gedurende minimaal 2 dagen bij 4°C
- Zuiver op met dialyse en gelfiltratie volgens protocol 29b
- Opmerking: De combinatie van gelfiltratie en dialyse wordt gebruikt om het salbutamol-HS-HRP te zuiveren van vrij salbutamol en salbutamol-HS
- Breng van de opgezuiverde oplossing 250 µl in een 1.5 ml epje en voeg hieraan 250 µl glycerol toe
- Meng 30 seconden met de whirlmix en bewaar daarna bij -18 °C
- Verdeel de rest van de opgezuiverde oplossing in fracties van 0.5 ml en bewaar deze in 2 ml flesjes bij -18 °C.

BIJLAGE IV: Protocol voor de uitvoering van IAC in combinatie met SPE.

PROTOCOL 1

AFFINITEITS-CHROMATOGRAFIE

BFA\10-7-90

Elutiepatroon van een sepharose/anti-clenbuterol cartridge gevolgd door c-18 solidphase extractie.

1. Affiniteitskolom spoelen met 3*5 ml water. (na bewaring in NaAz)
2. 5 ml gehydrolyseerde urine + 5 ml PBS-buffer pH 7.4 (controleer pH)
(bij een troebele oplossing centrifugeren 5 min 2500 rpm)
3. Opbrengen (2*5 ml), doorloop verwerpen.
4. Wassen met 5*1 ml water, doorloop verwerpen.
5. Desorptie met 5 ml 0.1M pH 3.5 HAC-opl., doorloop opvangen
6. Affiniteitskolom spoelen met 5 ml methanol/water (70/30)
7. HERHAAL DE STAPPEN 5 EN 6.
8. Kolom spoelen met 2*5 ml water.

De kolom is nu klaar voor de volgende analyse, bij het einde van een analyse de kolom "conserveren" door te spoelen met 5 ml 0.02% natriumazide-opl. Laat 1 ml op de kolom staan, sluit de kolom af en bewaar deze in de koelkast.

Voeg aan het eluaat 2.5 ml 1 M fosfaatbuffer pH 7.6 toe. Controleer de pH (range 7.2-7.6).

Vervolg de analyse met een c-18 SPE (1 cc bond-elut)

Activeer de C-18 kolom door resp. te spoelen met:
1 ml methanol, 1 ml water en 1 ml 0.4M fosfaatbuffer pH 7.6.

Breng het eluaat op de kolom, doorloop verwerpen.

Was de kolom met 1 ml water, doorloop verwerpen.

Laat de kolom korte tijd drogen m.b.v. het vacuum.

Elueer met 4*1ml methanol/acetonitril (85/15).

Damp het eluaat droog onder stikstof.

Vervolg het onderzoek met HPLC-UV of GC-MS.

Bereiding PBS-buffer.

PBS stockoplossing (PBS100): Los 539 mM Na₂HPO₄.2aq (192 gram) en 129 mM KH₂PO₄ op in 1600 ml water, stel de pH met 3M NaOH op pH 7.4 en vul aan met water tot 2 liter. PBS werkoplossing:

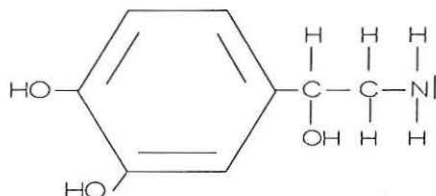
10 ml PBS100 + 9 gram NaCl aanvullen tot 500 ml met water. (wp5nl\piet\9)

Bijlage V: Overzicht van het bij het onderzoek gebruikte monstermateriaal.

RIKILT nr.	CLRVV nr.	monster type	diersoort	opmerking
	90 OS 2487	urine	mestkalf	positief voor clenbuterol
	90 OS 2527	urine	mestkalf	positief voor clenbuterol
	90 OS 2600	urine	mestkalf	positief voor clenbuterol
	90 OS 2991	urine	mestkalf	positief voor clenbuterol
	90 OS 2992	urine	mestkalf	positief voor clenbuterol
	90 OS 3064	urine	mestkalf	positief voor clenbuterol
	90 OS 3062	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3063	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3065	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3066	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3067	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3068	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3069	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3072	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3073	urine	mestkalf	negatief
	90 OS 3074	urine	mestkalf	negatief
90 18641		urine	mestkalf	positief voor salbutamol
90 18027		urine	mestkalf	positief voor salbutamol
90 18845		urine	mestkalf	positief voor salbutamol
90 18846		urine	mestkalf	positief voor salbutamol
90 18844		urine	mestkalf	positief voor salbutamol
90 18859		urine	mestkalf	verdacht voor mabuterol
90 18860		urine	mestkalf	verdacht voor mabuterol
90 18861		urine	mestkalf	verdacht voor mabuterol

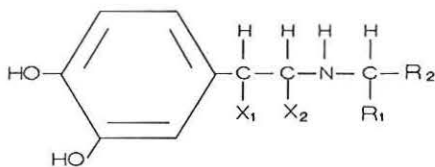
BIJLAGE VI

NOREPINEFRINE
(noradrenaline)



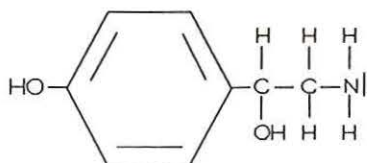
Antilichamen tegen norepinefrine, gekoppeld aan BSA via de amine, kunnen mogelijk kruisreacties vertonen met de volgende β -agonisten.

naam	X1	X2	R1	R2
Epinefrine	OH	H	H	H
Ethylnoradrenaline	OH	CH ₂ -CH ₃	als norepinefrine	
Nordefrine	OH	CH ₃	als norepinefrine	
Isoetarine	OH	CH ₂ -CH ₃	CH ₃	CH ₃
Isoprenaline	OH	H	CH ₃	CH ₃
Dopamine	H	H	als norepinefrine	
Dobutamine	H	H	CH ₃	C-C-fenol
Hexoprenaline	OH	H	(CH ₂) ₆ -norepinefrine	
Protokylol	OH	H	CH ₃	C-(C ₇ H ₅ O ₂)



BIJLAGE VII

OCTOPAMINE



Antilichamen opgewekt tegen octopamine, gekoppeld aan BSA via de amine, kunnen mogelijk kruisreacties vertonen met de volgende β -agonisten.

naam	X1	X2	R1	R2
Ractopamine	OH	H	H	C-C-fenol
Bamethaan	OH	H	H	C-C-C
Bufine	OH	CH3	CH3	C-C-fenyl
Isoxsuprine	OH	CH3	CH3	C-O-fenyl
Ritodrine	OH	CH3	H	C-fenol
Oxedrine	OH	H	H	H
Pholedrine	H	CH3	H	H
Hydroxyfedrine	OH	CH2-CH3	H	H
Fenoterol	H	CH3	H	C(OH)-fenyl
Hydroxyamfetamine	H	CH3	als octopamine	

